

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520071152543

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

**JNK 靶向逆转人肝癌细胞多药耐药**

**Reversal of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells by JNK**

马全明

指导教师姓名: 王效民教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

学位授予日期:

辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 4 月

靶向逆转人肝癌多耐药

马全明

指导教师

王效民

教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘 要

**目的:** 多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 细胞的存在是肝癌化疗失败的重要原因。有研究表明抗肿瘤药物能引起 JNK 信号传导系统的变化, 提示通过调节 JNK 有可能逆转 MDR。本课题应用抗癌药物阿霉素 (ADM) 诱导建立人肝癌多药耐药细胞 HepG2/ADM, 通过增高和降低肝癌多药耐药细胞 HepG2/ADM 中 JNK 的表达, 检测多药耐药细胞的耐药性的变化, 初步探讨 JNK 是否可作为逆转肝癌多药耐药细胞靶点的依据。

**方法:** 采用药物浓度梯度递增诱导法诱导亲本细胞建立人肝癌多药耐药细胞系 HepG2/ADM, 流式细胞仪分析细胞周期并检测多药耐药相关蛋白 P-gp (P-glycoprotein) 和 MRP1 (multidrug resistance protein 1) 表达。PCR 检测人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞中 JNK 的 mRNA 表达, western-blot 检测 JNK 蛋白表达。通过应用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 和特异性激活剂 Anisomycin 作用耐药细胞 HepG2/ADM, 然后通过 CCK8 检测其耐药性的变化。

**结果:** 1. 应用 ADM 诱导建立的人肝癌多药耐药细胞 HepG2/ADM, 对其他多种抗癌药物均产生耐药。应用流式细胞仪检测耐药细胞和亲本细胞的 P-gp 蛋白和 MRP1 蛋白水平及细胞周期。确定达到多药耐药标准, 可进行下一步实验。2. 通过 PCR 法和 western blot 法检查 JNK mRNA 和蛋白表达差异, 多药耐药细胞 HepG2/ADM 中 JNK1 mRNA, JNK2 mRNA 和蛋白表达水平均有不同程度降低。在分别应用 JNK 抑制剂 SP600125 和 JNK 激活剂 anisomycin 处理耐药细胞后, 测定耐药细胞的 IC<sub>50</sub>, 结果发现, 改变 JNK 活性后, 耐药细胞的耐药性发生变化。SP600125 处理组耐药性升高, anisomycin 处理组耐药性降低。

**结论:** 采用药物浓度梯度递增诱导法建立人肝癌多药耐药细胞系 HepG2/ADM。与亲本细胞相比较, 人肝癌多药耐药细胞系细胞周期分布发生改变, 这种改变不仅与耐药肿瘤细胞的增殖能力降低有关, 而且可能是多药耐药产生的机制之一, P-gp 参与了人肝癌多药耐药细胞系药物转运泵介导的耐药机制, 而 MRP1 与之无关。JNK 激酶在人肝癌多药耐药细胞和亲本细胞中均普遍表达; 对于 P-gp 介导 MDR 的人肝癌细胞多药耐药细胞, JNK 激酶的基因水平、蛋白水平的表达变化表现出下降趋势。多药耐药细胞耐药性变化与 JNK 表达变化呈一定关系。

上调和下调 JNK 蛋白表达后,耐药细胞的耐药性产生变化,与 JNK 表达呈负相关。提示 JNK 信号传导通路在人肝癌细胞产生多药耐药过程中,发挥了重要作用。初步为 JNK 成为逆转人肝癌多药耐药分子治疗靶点提供了理论依据。

**关键词:** JNK; 多药耐药; 肝癌

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

**Objective:** Multidrug resistance (MDR) is almost constantly expressed in hepatocellular carcinoma(HCC) and represent one of the major problems for cancer eradication by limiting the efficacy of chemotherapy. JNK activation will probably be a new method reverse the MDR. The aim of this research was to establish several MDR HCC cell lines by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of adriamycin (ADM), then change the expression of JNK in HCC MDR cells, detect the expression of JNKs in MDR cells and parental cells and explore the role of JNKs in HCC MDR.intending to provide the theoretical instructions for reverse of HCC MDR by targeting JNKs.

**Methods:** MDR HCC cell lines,HepG2/ADM were developed by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of ADM. CCK8 assay was used to determine drug sensitivity. Flow cytometry was employed to analyze cell cycle distribution and measure cell P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistant protein 1(MRP1) expression levels. JNK mRNA expression levels were measured by quantitative PCR. Expression JNKs were analyzed by Western blot. Using JNK inhibitor SP600125 and the specific activator Anisomycin to incubate the resistant cell HepG2/ADM, and then detected resistance by CCK8

**Result:** CCK8 assay showed that HepG2/ADM were resistant not only to ADM,but also to multiline anticancer drugs. Compared with parental cells , the P-gp expression was much higher in MDR HCC cells; however ,the MRP1 expression was not significantly higher. In addition, the percentage of HepG2/ADM cells was significantly increased in the G2/M phase. PCR analysis demonstrated that JNK1, JNK2 mRNA expression decreased significantly in HepG2/ADM cells. Western-blot analysis manifested that JNKs protein expression were relatively in similar tendency. SP600125 group resistance increased, anisomycin group resistance decreased.

**Conclusion:** MDR HCC cell lines, HepG2/ADM were established successfully

by exposing parental cells to stepwise increasing concentrations of ADM. Compared with that in the parental cells, the changes of cell cycle distribution in MDR HCC cells probably contributes to the lower ability of proliferation, moreover, might result in the MDR. MDR of HCC cells mainly attributes to the over-expression of P-gp but not MRP1. JNK1 and JNK2 activities are down-regulated in P-gp-mediated MDR HCC cells, and the decreased are in accordance with mRNA and protein expression. Resistance of MDR cell and the expression of JNK have a certain relationship. JNK signaling pathway play an important role in MDR.

**Key word** : JNK; Multidrug resistance; Hepatocellular carcinoma



# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
前 言.....	1
第一章 人肝癌多药耐药细胞模型的建立及鉴定.....	4
1.1 材料与方法.....	4
1.2 结 果.....	9
1.3 讨 论.....	13
1.4 小 结.....	14
第二章 JNK 的表达对人肝癌多药耐药细胞耐药性的影响 .....	15
2.1 材料和方法.....	15
2.2 结 果.....	24
2.3 讨 论.....	29
2.4 小 结.....	30
第三章 总 结.....	31
参考文献.....	32
英文缩略词表.....	38
综 述.....	39
致 谢.....	50

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Introduce</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 1 Establishment and identification of the hepatocellular carcinoma cell lines with multidrug resistance</b> .....	<b>4</b>
1.1 Materials and method .....	4
1.2 Result .....	9
1.3 Discussion .....	13
1.4 Summary .....	14
<b>Chapter 2 JNK in multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line decrease The resistance indices to the anticancer drugs</b> .....	<b>16</b>
2.1 Materials and method .....	16
2.2 Result .....	24
2.3 Discussion .....	29
2.4 Summary .....	30
<b>Chapter 3 Conclusion</b> .....	<b>31</b>
<b>Reference</b> .....	<b>32</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>38</b>
<b>Review</b> .....	<b>39</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>50</b>

## 前言

肝癌是世界多发恶性肿瘤，在肝癌的种种治疗中，化疗占据着重要地位，尤其是在中晚期肝癌的治疗中，化疗更是尤为重要的治疗手段<sup>[1]</sup>。但是化疗的效果一直不尽如人意。多药耐药（multidrug resistance MDR）现象是化疗失败的主要原因<sup>[2]</sup>。所以，如何解决肝癌细胞多药耐药的问题，成为近年来研究热点。

MDR 现象在 1970 年被发现<sup>[3]</sup>，是指肿瘤细胞在对某种化疗药物产生耐药的同时，也具有了对其他不同结构，不同作用靶位和不同抗癌机理的化疗药物的耐受性<sup>[4]</sup>。MDR 现象在临床多种肿瘤的化疗过程中，均普遍存在，成为癌症化疗失败的一个重要原因。P-糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp）、多药耐药相关蛋白（multidrug resistance-associated protein, MRP）及肺耐药蛋白（lung resistance protein, LRP）的过度表达，谷胱甘肽（glutathione, GSH）解毒系统的活化，拓扑异构酶活性降低等均是 MDR 发生的原因。目前对 MDR 的研究初步探明，MDR 产生的途径基本有以下几点：①多药耐药基因（mdr1）途径：肿瘤细胞 mdr1 基因扩增，其编码的蛋白 P-gp 表达增高。P-gp 作为一种 ATP 依赖“药泵”，可将细胞内的抗肿瘤药物泵出细胞，是细胞内药物浓度降低，而使药物无法杀死肿瘤细胞<sup>[5]</sup>。②多药耐药相关基因（mrp）和肺癌多药耐药基因（lrp）途径：肿瘤细胞 mrp 基因编码的 MRP 蛋白参与胞质囊泡运输，其高表达后，使细胞内药物重新分布，导致核酶等重要靶点药物减少，同时泵出负电荷药物，最终产生 MDR。在 MDR 肝癌细胞中，部分可见 lrp 表达明显增高，说明 lrp 与 MDR 有直接关系。③抗细胞凋亡信号增强途径：肿瘤细胞内抗凋亡信号增强，是 MDR 产生的重要途径之一<sup>[6]</sup>。④谷胱甘肽酶系统激活途径：GSH 是 mrp 泵底物，谷胱甘肽转移酶（glutathione-s-transferase, GST）能够偶联 GSH 到化疗药物，增加药物外流，因此，肿瘤 MDR 细胞 GSH 和 GST 水平与其耐药程度呈正相关。⑤改变 DNA 拓扑异构酶途径：肿瘤细胞拓扑异构酶减少或者活性降低，药物靶点和 DNA 不易形成复合物，对药物敏感性下降，随即发生 MDR<sup>[7]</sup>。

目前比较常用的几种逆转肝癌细胞 MDR 的方法主要是通过以下几个方面：①反义技术：反义技术是用载体将反义寡核苷酸导入细胞，与 mRNA 特异性结合，抑制相关基因复制及转录，在剪接、转运和翻译水平上限制相关蛋白合成，

从而使细胞 MDR 得以逆转<sup>[8]</sup>。但是,反义核酸导入困难、非特异性结合等困难是此项技术的缺点。②单克隆抗体封闭和免疫靶导向逆转:P-gp 单克隆抗体与 MDR 肿瘤细胞共培养,能逆转肿瘤 MDR,但单克隆抗体细胞毒性大,应用受限。免疫靶导向应用免疫毫微粒等包裹和缓释药物,在细胞内释放药物而逆转 MDR<sup>[9]</sup>。③化学药物逆转:化学药物逆转是一种传统的方法,所采用的药物有:钙通道阻滞剂维拉帕米、免疫调节剂环孢菌素 A 等,可以逆转 *mdr1* 相关的肿瘤 MDR,但对 *mrp* 介导的 MDR 细胞仅有部分逆转作用或者相对无效<sup>[10]</sup>。④修饰正常细胞,相对逆转 MDR:逆转录病毒介导 *mdr1* 转染骨髓并表达,提高骨髓细胞对药物的耐受,可进行大剂量和多次化疗来提高疗效,但只是相对实现对肿瘤 MDR 的逆转。由此可见,肝癌 MDR 逆转,尚无有效适当的方法。

近年来,随着临床与实验技术的发展,生物制剂、基因疗法等众多新兴医学领域越发的受到重视。通过基因手段增加肝癌细胞对化疗药物的敏感性也取得了一定的进展。信号通路也越发的被研究人员所重视。试图通过影响信号通路来逆转的 MDR 的研究也越来越多<sup>[11,12]</sup>。

肝癌细胞发生 MDR 过程,涉及多种细胞生理活动,需要依赖于细胞内信号传导系统与多种激酶系统的激活。研究显示,抗肿瘤药物能够引起 MAPKs 信号传导系统的激活和 MDR 的产生<sup>[13]</sup>。

丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)是生物体内重要的信号转导系统,是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,通过高度保守的三级激酶级联传递信号激活,激活的 MAPK 可通过磷酸化转录因子、细胞骨架相关蛋白、酶类等多种底物来调节多种细胞生理过程。目前,已在哺乳动物细胞克隆和鉴定了细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 和 ERK5 或 BMK1 等 4 个 MAPK 亚族。

JNK 信号通路是 MAPK 中重要的通路之一,又被称为应激激活蛋白激酶,参与细胞应激诱导的细胞凋亡,Fas、TNF 诱导的细胞凋亡以及近年来发现的化疗药物诱导的细胞凋亡等。JNK 蛋白可由 3 个基因编码。*Jnk1* 和 *Jnk2* 基因存在于多种组织,而 *Jnk3* 基因局限于在脑、心脏、睾丸中表达。JNK 基因通过选择性剪接而产生 10 种 JNK 形式<sup>[14]</sup>。JNK 基因编码的蛋白具有或无 COOH- 末端,结果产生 46 kDa 和 55 kDa 两种蛋白。第二种剪接是选择性编码 JNK 功能区

的两个外显子中的一个,但只限于 JNK1 和 JNK2 基因。不同的组织发出不同的指令,通过选择性剪接, JNK 改变了停泊位点与底物结合能力,决定了作用底物的特异性<sup>[15]</sup>。

JNK 在传导胞外信号至核转录因子时起着重要作用,可以提高转录能力。JNK 信号途径存在于多种生命过程中,如细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞死亡。有多种刺激信号都可介导 JNK 的活化,如生长因子、细胞因子和环境应激<sup>[16, 17]</sup>。

由于 MAPK 通路在调节肿瘤细胞增殖、侵袭及生存等方面发挥着重要作用,因而 MAPK 是否成为肿瘤治疗或干预作用靶点一直都是研究的热点问题。药物制剂可以抑制 MAPK 通路内的多种激酶和鸟苷三磷酸激酶 (GTPases)<sup>[18, 19]</sup>。对于 JNK,一些研究发现, JNK 激活程度与肿瘤化疗敏感性存在正相关,而另一些研究则发现, JNK 的持续激活与肿瘤细胞耐药性呈正相关<sup>[20-22]</sup>。产生这种截然相反的结果,很可能是由于 JNK 功能具有细胞类型和条件依赖性<sup>[23, 24]</sup>。

JNK 信号转导通路在肿瘤化疗耐药中的作用正逐渐为研究人员所重视,目前,已发现一些能够特异性阻断和激活 JNK 信号传导通路的药物。有迹象表明,通过调节 MAPK 酶系统的表达,有可能逆转 MDR,成为逆转 MDR 的新方法<sup>[25]</sup>。近来研究表明,JNK 与多种疾病发生机制有关,从而使 JNK 在临床上可做为一个潜在的分子治疗靶点。

本课题采用阿霉素 (adriamycin ADM) 诱导肝癌细胞 HepG2, 建立稳定的 MDR 肝癌细胞模型,并对肝癌细胞 (MDR<sup>+</sup>/MDR<sup>-</sup>细胞) 中 JNK 表达谱进行研究,并通过抑制和激活 JNK 酶表达的药物作用 MDR<sup>+</sup>细胞,观测其耐药性的变化,深入探讨 JNK 的表达与活性对肝癌细胞 MDR 的影响,期望能为 JNK 做为逆转肝癌多药耐药治疗分子靶点提供理论依据。

## 第一章 人肝癌多药耐药细胞模型的建立及鉴定

### 1.1 材料与方法

#### 1.1.1 试剂和仪器

HepG2 人肝癌细胞株	厦门大学附属中山医院开放实验室
DMEM 高糖	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	美国 GIBCO 公司
0.25%胰酶	美国 GIBCO 公司
100×双抗	美国 GIBCO 公司
CCK-8 试剂盒	碧云天生物技术研究
阿霉素 (ADM)	浙江海正药业股份有限公司
5-氟尿嘧啶 (5-FU)	浙江海正药业股份有限公司
顺铂 (CDDP)	浙江海正药业股份有限公司
环磷酰胺 (CTX)	浙江海正药业股份有限公司
丝裂霉素 (MMC)	浙江海正药业股份有限公司
长春新碱 (VCR)	浙江海正药业股份有限公司
P-gp 单克隆抗体 (FITC)	Abcam 公司
MRP1 单克隆抗体 (FITC)	BD 公司
同型阴性对照单克隆抗体(FITC)	Abcam 公司
破膜剂	BD 公司
RNA 逆转录试剂盒	日本 Fermentas 公司
Trizol	美国 Biobasic 公司
PCR 试剂盒	日本 Takara 公司
<b>PBS:</b> 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 和 0.24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4 加水定容至 1L。	
<b>PBST:</b> 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 和 0.24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2ml tween-20, 调整 PH 至 7.2。	

**细胞冻存液：**DMEM 高糖溶液：胎牛血清：二甲基亚砷，以 7：2：1 的比例混匀，冻存备用。

**磷酸盐缓冲液 (PBS):**

**A 液：** 0.2mol/L 磷酸二氢钠水溶液， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6g，溶于蒸馏水中，最后补加蒸馏水至 1000ml。

**B 液：** 0.2mol/L 磷酸氢二钠水溶液， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.6g（或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6g, 或  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35.6g），加蒸馏水溶解，最后加水至 1000ml。若再加蒸馏水至 200ml 则成为 0.1mol/LPB。

**4%多聚甲醛磷酸缓冲液：**称取 40g 多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入 500~800ml 0.1mol/L 磷酸缓冲液，加热至 60℃左右，持续搅拌使粉末完全溶解，通常需滴加少许 NaOH 溶液才能使溶液清亮，最后补足 0.1mol/L 的磷酸缓冲液于 1000ml，充分混匀。

**10%中性甲醛：**称取 1g 中性甲醛粉末，加入 10ml 的三蒸水中，密封，60℃水浴中过夜才能溶解。配好的溶液 1 个星期内有效，4℃保存。

**主要实验仪器**

生物安全柜	Forma class 2 A2	美国 Thermo 公司
CO2 细胞培养箱	Forma Series2 HEPE class 2	美国 Thermo 公司
倒置相差（荧光）显微镜	DMIL	德国 Leica
细胞计数板		南京裕安仪器有限公司
激光共聚焦显微镜	FV1000	日本 OLYMPUS 公司
透射电镜	JEM-2100HC	日本 JEOL 公司
低速离心机	L420	湖南湘仪
低温高速离心机	5804R	美国 Eppendorff 公司
流式细胞仪	EPICS XL	美国 Beckman 公司
PH 分析仪	ADWA AD8000	上海拿华电子科技有限公司
酶标仪	Model 680	美国 Biorad 公司
-80℃超低温冰箱	Forma 700 series	美国 Thermo 公司
细胞培养皿/瓶	Corning	美国 Corning 公司

### 1.1.2 实验方法

1.1.2.1 采用药物浓度梯度递增诱导法诱导亲本细胞 HepG2 建立人肝癌多药耐药细胞系。

复苏细胞 HepG2，培养 2~3 代使细胞生长稳定。待细胞生长至 80%融合时，将培养基换为含低浓度药物的培养基，HepG2 培养基加入 1%含 0.01mg/L 的 ADM。药物作用 24 小时后更新不含药物的培养基。传代。待细胞生长至 80%融合时，加入倍增浓度药物培养基。重复以上步骤，直至细胞能够在高浓度药物 0.2mg/L ADM 的培养基中维持生长。所得细胞暂命名为 HepG2/ADM。取培养 3 代并处于指数生长期的细胞用于研究。通过光镜和电镜观察其形态学变化。

#### 1.1.2.2 CCK8 法测定人肝癌多药耐药细胞株的多要耐药性

(1) 取对数期生长 HepG2 和 HepG2/ADM，常规消化后，制备成单细胞悬液，以每孔加入 200ul (5000 个/孔) 细胞悬液接种到 96 孔板。

(2) 同一般培养条件，培养至细胞贴壁，PBS 冲洗 3 次，将培养基换为含梯度浓度药物的培养液，空白对照孔为不含药物的培养液。设定 5 个梯度 (10 倍梯度)。每个浓度梯度设 5 个复孔。药物作用 24 小时后，吸弃孔内培养上清液。

(3) 每孔加 200  $\mu$  L 不含药物的培养液，20  $\mu$  L CCK8 溶液。37° 继续孵育 1 小时，终止培养。

(4) 选择 450nm 波长，在酶标仪上测定各孔光吸收值，记录结果。

(5) 以药物浓度为横坐标，细胞存活率为纵坐标绘制剂量-效应曲线。

(6) 采用改良寇式法计算各药物对细胞的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC50)，计算公式如下：

$$\text{LgIC}_{50} = \text{Xm} - \text{I}(\text{P} - (3 - \text{Pm} - \text{Pn})/4)$$

Xm:lg 最大剂量

I: lg (最大剂量/相临剂量)

P: 阳性反应率之和

Pm: 最大阳性反应率

Pn: 最小阳性反应率

(7) 按以下公式计算耐药指数 (resistance index, RI)

$\text{RI} = \text{IC}_{50} \text{ 耐药细胞} / \text{IC}_{50} \text{ 亲本细胞}^{[33]}$ 。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库